

Année de l'AAP : 2007

Projet N° 07024 Achevé

Titre du projet : Le transport de l'auxine, régulateur-clé des réponses de développement racinaire à l'azote chez *Arabidopsis thaliana* et *Casuarina glauca*.

Unité responsable du projet : BPMP (Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes) (CNRS, INRA, SupAgro, UMI)

Porteur de projet : Alain Gojon (gojon(a)supagro.inra.fr)

Pays associé au projet : Royaume-Uni

Unités de recherche du réseau scientifique d'Agropolis Fondation associés : AGAP, DIADE

Sous-axes thématiques : BIP-1: Génétique et génomique, amélioration des plantes, écophysiologie

Objectifs :

L'une des principales caractéristiques des végétaux est leur capacité à réagir aux fortes fluctuations de l'environnement par une modification profonde de leur développement. C'est particulièrement vrai dans le cas de la réponse au stress nutritif, l'une des contraintes abiotiques les plus fréquentes auxquelles les plantes soient confrontées. Le stress nutritif a d'importants effets sur l'architecture racinaire, déclenchés par des voies signalétiques spécifiques. Dans le cas du nitrate (NO₃⁻) et du phosphate (PO₄), on a montré que ces voies signalétiques impliquaient l'auxine, une phytohormone essentielle dans le développement racinaire. L'auxine joue un rôle particulièrement crucial dans la formation et la croissance des racines latérales, qui dépendent de l'établissement de gradients locaux d'auxine au point d'initiation d'une racine latérale et dans la jeune racine latérale émergente.

L'objectif de ce projet est d'étudier comment la disponibilité en azote module les gradients d'auxine au sein du système racinaire, et de quelle manière cela provoque une évolution du développement des racines. Deux modèles biologiques seront utilisés : i) *Arabidopsis thaliana*, pour laquelle le but est de déterminer comment la détection du nitrate (NO₃⁻) par les transporteurs de NO₃⁻ régule l'architecture racinaire par l'altération du transport de l'auxine, et ii) *Casuarina glauca*, une plante tropicale sur laquelle on cherche à déterminer le rôle du transport d'auxine dans la formation des nodules fixateurs d'azote causée par le déficit en azote.

La question commune qui se pose pour les deux espèces est de savoir comment l'azote module le transport de l'auxine pour réguler la croissance des racines latérales (chez *Arabidopsis*) ou la formation d'une racine latérale modifiée, le nodule actinorhizien, (chez *Casuarina*). Cela élargira les connaissances acquises sur l'espèce modèle *A. thaliana* à une plante tropicale qui est une espèce pionnière importante dans la réhabilitation des sites pauvres ou dégradés des pays tropicaux et subtropicaux.

L'étude des gradients d'auxine dans les tissus racinaires constitue un défi, car les concentrations et les flux locaux d'auxine sont difficiles à déterminer. Le projet vise à surmonter cette difficulté en développant des approches complémentaires.

Actions menées et résultats obtenus :

L'objectif du projet était d'étudier l'influence de la disponibilité de l'azote sur les gradients de l'hormone végétale auxine dans le système racinaire et ses conséquences sur le développement des racines ou des nodosités fixatrices d'azote. 2 modèles biologiques ont été utilisés: i) *Arabidopsis thaliana*, pour lequel l'objectif était de déterminer comment la perception du nitrate (NO₃⁻) par AtNRT1.1 régule l'architecture racinaire via des modifications de transport d'auxine, et

ii) *Casuarina glauca*, pour lequel le but était de comprendre le rôle de l'auxine dans la formation des nodosités fixatrices d'azote formées en conditions de carence azotée.

Chez *Arabidopsis*, nous savions au début du projet que le transporteur de nitrate NRT1.1 contrôle la croissance des racines latérales car il intervient également dans un transport d'auxine régulé par le nitrate (schématiquement: en absence de nitrate, NRT1.1 transporte de l'auxine; en présence de nitrate, NRT1.1 transporte du nitrate mais plus d'auxine). Le rôle de NRT1.1 est de freiner la croissance des racines latérales en y limitant l'accumulation d'auxine lorsque la disponibilité externe en nitrate est faible, mais pas lorsqu'elle est forte. L'hormone ne s'accumule donc fortement que dans les racines au contact d'une concentration élevée de nitrate. Puisque l'auxine stimule la croissance des racines latérales, ceci permet à la plante de favoriser cette croissance spécifiquement dans les zones du sol où le nitrate est abondant. Le mécanisme par lequel NRT1.1 prévient l'accumulation d'auxine dans les racines restait cependant mystérieux. La localisation de la protéine NRT1.1 (obtention puis étude de transformants NRT1.1-GFP) a révélé que ce transporteur est spécifiquement exprimé dans les tissus de la racine latérale impliqués dans le transport basipète de l'hormone hors de la racine latérale vers les tissus vasculaires de la racine principale. La suite du travail a permis de réaliser deux types d'observations intéressantes: (1) l'expression de la protéine NRT1.1 est réprimée par l'azote, et (2) le nitrate régule également l'expression de plusieurs autres transporteurs d'auxine (LAX3, PIN1, PIN2). Brièvement, ces observations ont révélé qu'une carence en azote favorise l'expression précoce de NRT1.1 dans les jeunes primordia de racines latérales. Cette expression précoce semble associée à un avortement des primordia, suggérant que NRT1.1 ne fait pas que moduler la vitesse de croissance des racines, mais contrôle également une étape-clé du développement initial. D'autre part, l'effet du nitrate sur les autres transporteurs d'auxine (répression de PIN1 et PIN2 et stimulation de LAX3) indique un contrôle général du trafic hormonal dans les racines par l'azote, dont le mécanisme impliquant NRT1.1 ne constitue qu'un aspect. Ces résultats sont originaux et ouvrent de nouvelles perspectives. Des expériences complémentaires sont en cours pour compléter ces résultats.

Chez *Casuarina*, la formation des nodosités actinorhiziennes en conditions de carence azotée et en symbiose avec la bactérie du sol *Frankia* s'accompagne de l'expression du transporteur d'influx d'auxine CgAUX1 dans les cellules infectées par la bactérie symbiotique. Des dosages d'auxine nous ont permis de mettre en évidence une plus forte accumulation d'acide indole acétique (IAA) et d'acide phénylacétique (PAA) dans les nodules que dans les racines non infectées. Des expériences d'immunolocalisation de ces deux molécules indiquent qu'elles s'accumulent préférentiellement dans les cellules infectées par *Frankia*. Par ailleurs, l'immunolocalisation de transporteurs d'efflux d'auxine de type PIN1 a révélé la présence de ces transporteurs dans les cellules non-infectées qui entourent les cellules infectées par *Frankia* dans les nodules de *C. glauca*. Une approche de modélisation nous a permis de montrer que cette répartition des transporteurs d'auxine dans les nodules conduit à une accumulation spécifique d'auxine dans les cellules infectées par *Frankia*. Une analyse du génome de *Frankia* et l'étude de l'expression de gènes de *Frankia* nous indique également une production d'auxine (IAA et PAA) par la bactérie in planta. L'ensemble de ces résultats indique un lien entre l'auxine et l'infection symbiotique.

En résumé, les travaux entrepris ont donné d'excellents résultats. Ceci est d'autant plus vrai que chaque partie (*Arabidopsis* et *Casuarina*) ne correspond qu'à un an du travail de F. Perrine-Walker, qui a été particulièrement efficace. Des approches et des questionnements similaires ont été utilisés sur les deux modèles et ont permis une forte interaction entre les deux parties du projet.

Articles :

Gojon A, Krouk G, Perrine-Walker F, Laugier E. 2011. Nitrate transceptor(s) in plants. *J Exp Bot* 62: 2299-2308.

Krouk G, Ruffel S, Gutiérrez RA, Gojon A, Crawford NM, Coruzzi GM, Lacombe B. 2011. A framework integrating plant growth with hormones and nutrients. *Trends Plant Sci* 16: 178-182.

Perrine-Walker F, Doumas P, Lucas M, Vaissayre V, Beauchemin NJ, Band LR, Chopard J, Crabos A, Conejero G, Péret B, King JR, Verdeil JL, Hocher V, Franche C, Bennett MJ, Tisa LS, Laplaze L. 2010. Auxin carriers localization drives auxin accumulation in plant cells infected by *Frankia* in *Casuarina glauca* actinorhizal nodules. *Plant Physiol* 154: 1372-1380.

Gabriel Krouk, Benoît Lacombe, Agnieszka Bielach, Francine Perrine-Walker, Katerina Malinska, Emmanuelle Mounier, Klara Hoyerova, Pascal Tillard, Sarah Leon, Karin Ljung, Eva Zazimalova, Eva

Benkova, Philippe Nacry, Alain Gojon (Jun 2010) Nitrate-regulated auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants. *Dev. Cell* 18(6):927-937

Péret B, De Rybel B, Casimiro I, Benková E, Swarup R, Laplaze L, Beeckman T, Bennett MJ. 2009 *Arabidopsis* lateral root development: an emerging story. *Trends Plant Sci.* 14: 399-408.

Perspectives :

Le travail sur *Arabidopsis* se poursuit pour déterminer si NRT1.1, en plus de son rôle dans le contrôle de la vitesse de croissance des racines latérales, agit également sur les étapes précoces du développement (études cinétiques de l'expression de NRT1.1 au cours du développement des primordia, associées à une analyse de la viabilité de ces primordia). L'étude de l'effet du nitrate sur l'expression des autres transporteurs d'auxine sera poursuivie dans un fond génétique mutant pour NRT1.1, de manière à révéler un rôle éventuel de cette protéine dans la régulation des autres transporteurs d'auxine.

Le travail sur *Casuarina* sera poursuivi pour essayer de déterminer quel est le rôle de l'auxine au cours de l'infection symbiotique. Pour cela, nous utiliserons une puce ADN 15K *Casuarina* pour analyser l'expression des gènes dans les nodules en présence ou absence d'un inhibiteur de l'influx d'auxine (NOA). Cela devrait nous permettre d'identifier les gènes symbiotiques dont l'expression est régulée par l'auxine. Par ailleurs, une forme dominante négative d'un régulateur transcriptionnel de la réponse à l'auxine (CgIAA7-DN) a été généré dans notre équipe et sera exprimé dans les cellules infectées pour inhiber la réponse à l'auxine spécifiquement dans ces cellules. L'effet de cette inhibition sur l'interaction symbiotique sera déterminé.

Financement total par Agropolis Fondation : 117 265 € (salaire pour un post-doctorant, frais de déplacement, frais de fonctionnement, participation à un atelier)

Catégorie(s) de soutien : Allocation post-doctorale

Durée du projet : 1^{er} mars 2008 – 24 novembre 2010

Mots clés : auxine – *Arabidopsis thaliana* – *Casuarina glauca* – développement des racines – azote